

6.

LI ANSWER 1 OF 2 CAPLUS COPYRIGHT 2002 ACS
AN 1998:108105 CAPLUS
DN 129:256474
TI Novel antibiotics, AB5362-A, B, and C, their manufacture, their use as
fungicides, and Phoma species AB5362
IN Tezuka, Yasuyuki; Takahashi, Atsushi; Maruyama, Masato; Tamamura, Takeshi;
Kutsuma, Seiichi; Naganawa, Hiroshi; Takeuchi, Tomio
PA Hokko Chemical Industry Co., Ltd., Japan; Microbiochemical Research
Foundation
SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 20 pp.
CODEN: JTKXAF
DT Patent
LA Japanese
FAN.CNT 1

| | PATENT NO. | KIND | DATE | APPLICATION NO. | DATE |
|----|-------------|------|----------|-----------------|--------------|
| | ----- | --- | ----- | ----- | ----- |
| PI | JP 10045662 | A2 | 19980217 | JP 1996-204627 | 19960902 <-- |
| GI | | | | | |

* STRUCTURE DIAGRAM TOO LARGE FOR DISPLAY - AVAILABLE VIA OFFLINE PRINT *

AB AB5362-A (I), AB5362-B (II), and AB5362-C (III) useful as medical and agrochem. fungicides, are manufd. by cultivation of Phoma sp. capable of producing the antibiotics. Phoma sp. AB5362 is also claimed. Phoma sp. AB5362 was shake-cultured in a medium contg. glucose, starch, polypeptone, yeast ext., etc., at 25.degree. for 6 days, and antibiotics I and II isolated from the culture filtrate. II 10 ppm showed 100% antifungal activity against Pseudoperonospora cubensis without damaging cucumber.

5.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-45662

(43) 公開日 平成10年(1998) 2月17日

| (51) Int. Cl. ⁶ | 識別記号 | 序内整理番号 | P I | 技術表示箇所 |
|----------------------------|------|---------|----------------|--------|
| C 0 7 C 49/757 | | 8114-4H | C 0 7 C 49/757 | |
| A 6 1 K 31/12 | ADZ | | A 6 1 K 31/12 | ADZ |
| | | | 31/14 | |
| | | | 31/365 | |
| C 0 7 D 307/93 | | | C 0 7 D 307/93 | |

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-204627

(22) 出願日 平成 8 年(1996) 8 月 2 日

(71) 出願人 000242002

北興化学工業株式会社

東京都中央区日本橋本石町 4 丁目 4 番 20 号

(71) 出願人 000179913

財団法人微生物化学研究会

東京都品川区上大崎 3 丁目 14 番 29 号

(72) 発明者 手塚 保行

神奈川県厚木市森の里 2 丁目 24 番 7 号

(72) 発明者 高橋 薫

神奈川県川崎市多摩区宿河原 2 丁目 42 番 25
- 201 号

(74) 代理人 弁理士 八木田 茂 (外 2 名)

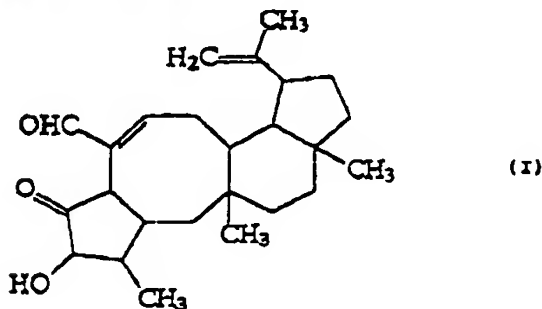
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規抗生物質 AB5362-A、-B および -C ならびにその製造法と用途

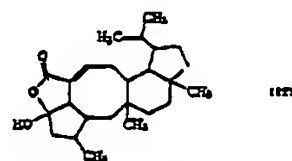
(57) 【要約】

【課題】 医療用抗真菌剤として有用である抗真菌活性を有し且つ農薬用殺菌剤として有用である抗菌活性を示す新規な抗生物質を提供する。

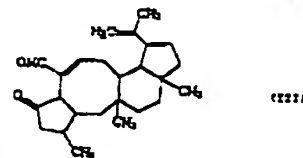
【解決手段】 次式



で表される新規な抗生物質 AB5362-A、および次式



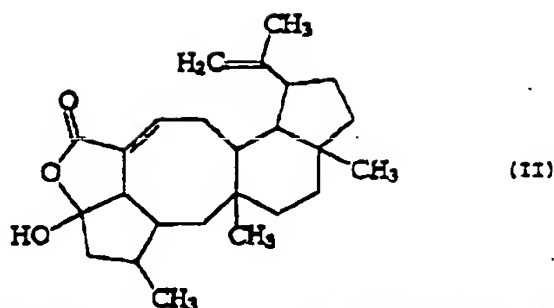
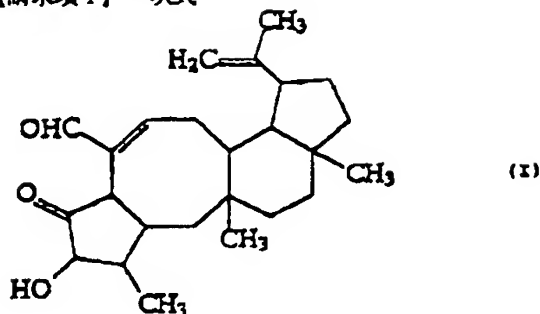
で表される新規な抗生物質 AB5362-B、ならびに次式



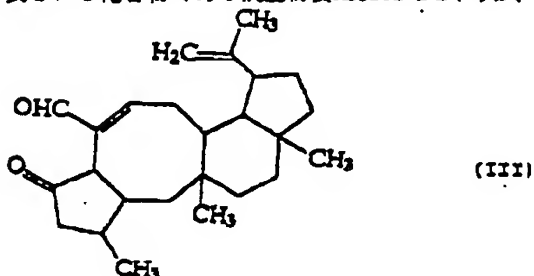
で表されて比旋光度 $[\alpha]_D^{25} -72^\circ$ (c 1.0, アセトニトリル) を有する白色粉末状の抗生物質 AB5362-C がホーマ属に属する抗生物質 AB5362 生産菌、例えばホーマ・エスピー AB5362 株の培養により得られた。これら抗生物質 AB5362-A、-B および -C は抗真菌活性と植物病原菌に対する抗菌活性とを有し、新規な医療用抗真菌剤として有用であり、また農薬用殺菌剤として、特にキュウリべと病の防除剤として有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次式



で表される化合物である抗生物質AB5362-Bと、次式



で表されて比旋光度 $[\alpha]_D^{25} -72^\circ$ (c 1.0, アセトニトリル)を有する白色粉末状の化合物である抗生物質AB5362-Cとからなる群から選ばれる抗生物質。

【請求項2】 ホーマー属に属して請求項1に記載の抗生物質AB5362-A、AB5362-BおよびAB5362-Cの生産菌を培地で培養し、その培養物中に抗生物質AB5362-A、AB5362-BおよびAB5362-Cを生成し蓄積させ、次いでその培養物から抗生物質AB5362-A、AB5362-BおよびAB5362-Cのうちの少なくとも一つを採取することを特徴とする、抗生物質AB5362-A、AB5362-Bおよび(または)AB5362-Cの製造法。

【請求項3】 請求項1に記載の抗生物質AB5362-A、AB5362-BおよびAB5362-Cのうちの少なくとも一つを有効成分として含有することを特徴とする医療用抗真菌剤。

【請求項4】 請求項1に記載の抗生物質AB5362-A、AB5362-BおよびAB5362-Cのうちの少なくとも一つを有効成分として含有することを特徴とする農薬用殺菌剤。

【請求項5】 請求項1に記載の抗生物質AB5362-A、AB5362-BおよびAB5362-Cを産生できる特性を持ち、かつ後

で表される化合物である抗生物質AB5362-Aと、次式

記する菌学的特性を有するホーマ・エスピーAB5362(*Phoma* sp. AB5362)菌株。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は人間および動物に感染する真菌に対する抗真菌活性と植物の病原菌に対する抗菌活性を有する新規な抗生物質AB5362-A、AB5362-BおよびAB5362-Cに関し、またそれらの製造法およびその用途に関する。

【0002】 更に詳しく言えば、本発明はホーマ属に属する抗生物質AB5362生産菌を培養して生産される新規な抗生物質AB5362-A、AB5362-BおよびAB5362-Cに関し、またこれら新規な抗生物質の製造法に関し、さらにこれら抗生物質の用途に関する。しかもまた、本発明は抗生物質AB5362の生産菌として有用である新規微生物であるホーマ・エスピー AB5362株に関するものである。

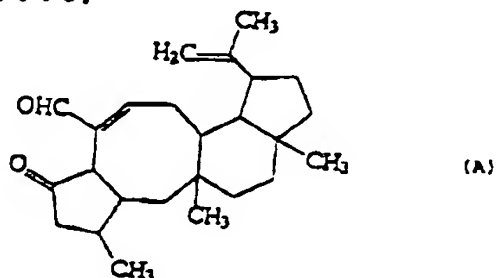
【0003】 本発明による新規な抗生物質AB5362-A、-Bおよび-Cは、人間および動物に感染する真菌に抗真菌活性を有することから真菌感染症に対する化学療法剤として有用であり、また植物病原菌に対して抗菌活性を有し且つ植物病害防除試験にても実際に優れた防除効果を示すことから農薬用殺菌剤として有用である。

【0004】

【従来の技術】 微生物が生産する抗生物質のうち、医療用の抗真菌性抗生物質としては、アンホテリシンBおよびナイスタチン等が知られ、また農薬用殺菌剤としては、カスガマイシンおよびバリダマイシン等が知られている。また、本発明の抗生物質AB5362-A、-Bおよび-Cと化学構造が近似の物質としては、アンジオテンシンII

レセプターの阻害物質であるバリエコリン(Variecolin) [Ilsens, O. D. et al. J. Org. Chem., 56巻、10号、3399-3403頁(1991年)] が従来知られている。この文献の3399頁には、バリエコリンの相対立体構造式が示されるが、それを平面構造式に書き直すと次式(A)のとおりである。

【0005】



バリエコリンはアスペルギルス・バリエカラー MF138株(米国メルク社のカルチュアコレクション保存株)の固相培養により得られた物質である。この分子式は $C_{25}H_{36}O_2$ で分子量は368である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】従来知られる医療用の抗真菌性抗生物質は、臨床で実用される薬剤が僅かに限られていること、さらにその副作用を示すものが多いことから、抗真菌剤として有用な新しい抗生物質が常に要望されている。農園芸用殺菌剤として用いる抗生物質についても、耐性菌の出現、薬害および施用の安全性の面から、従来開発された殺菌剤とは異なる作用機作あるいは新規な化学構造をもつ物質が同様に要望されている。特に、キュウリ等のべと病の防除に有効である抗菌性物質は、現在までに僅かしか知られておらず、それらの既知の物質の防除効果も充分ではなく問題があった。本発明の目的は、上記の課題に対応できる優れた抗真菌活性

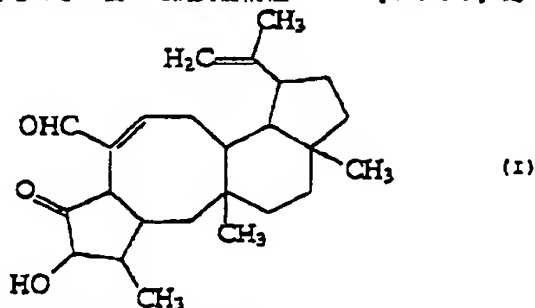
を有し且つ植物病原菌に対する抗菌活性と防除活性を有して農園芸用殺菌剤として望ましい性質をもつ新規で有用な抗生物質を提供することである。また、そのような新規な抗生物質の製造法を確立することであり、それによって前記の要望を解決しようとするものである。

【0007】

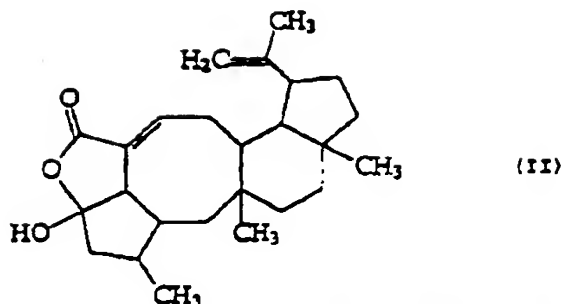
【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の課題を解決する目的のために、種々の土壌および植物などから多くの微生物を分離し、それらの微生物が培養液中に生産する抗生物質について鋭意研究を重ねた。その結果、糸状菌の一種であるホーマ属に属する新規な菌株を土壌試料から単離することに成功し、ホーマ・エスビー AB5362株と命名した。またその菌株の培養液中に抗真菌活性と抗かび活性を示す3種の抗生物質が生産されていることを発見した。そこで、該微生物の培養物から抗真菌活性を指標にして活性な3種の抗生物質を単離精製したところ、得られた3種の抗生物質が上記の抗真菌活性または植物病原菌に対する抗菌活性を示すことを見いだした。さらに、このようにして得られた抗生物質についてそれらの構造式を決定したが、これら抗生物質の化学構造および生物活性の対象、効果などを含めた諸性質の点で既知の抗生物質と一致しない新規な抗生物質であって抗真菌活性および植物病原菌に対する抗菌活性を有することを確認した。その結果、これらをそれぞれに抗生物質AB5362-A、抗生物質AB5362-B および抗生物質AB5362-C と称することにした。

【0008】なお、ここで本発明者が得た抗生物質AB5362-Cは、その平面構造式の面で見るとバリエコリンと同じであるが後記のとおり赤外吸収スペクトルおよび紫外吸収スペクトルの吸収ピークの点で微妙に相違し且つ旋光度でも微妙に相違するから、バリエコリンとは区別できる新規な物質であると推認した。

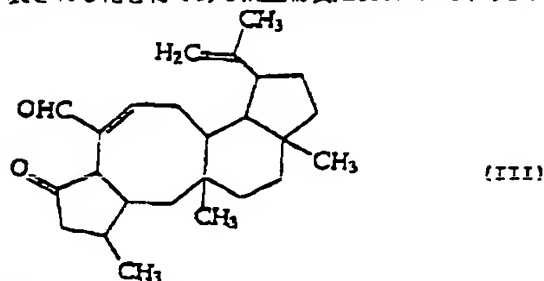
【0009】従って、第1の本発明によると、次式



で表される化合物である抗生物質AB5362-A と、次式



で表される化合物である抗生物質AB5362-Bと、次式



で表されて比旋光度 $[\alpha]_D^{25} -72^\circ$ (c 1.0, アセトニトリル)を有する白色粉末状の化合物である抗生物質AB5362-Cとからなる群から選ばれる抗生物質が提供される。

【0010】次に、第1の本発明による抗生物質AB5362-Aの物理化学的性質を記載する。

- (1) 外 観：白色粉末
- (2) 分子式： $C_{25}H_{35}O_3$
- (3) 分子量：384
- (4) 比旋光度： $[\alpha]_D^{25} +120.0^\circ$ (c 1.0, アセトニトリル)
- (5) 紫外外部吸収スペクトル (アセトニトリル溶液中)：

λ_{max} 、nm(ϵ): 242(8,140)

【0011】(6) 赤外部吸収スペクトル(KBr錠)：添付図面の図1に示す。

(7) 1H -NMRスペクトル(500MHz、重クロロホルム中で測定)：添付図面の図2に示す。

(8) ^{13}C -NMRスペクトル(125MHz、重クロロホルム中で測定)：添付図面の図3に示す。

(9) 溶解性：メタノールのような低級アルコール、酢酸エチル、クロロホルムに可溶、水に不溶である。

【0012】(10) 薄層クロマトグラフィー：Rf値=0.31

吸着剤としてメルク社製キーゼルゲル 60F₂₅₄ (Art. 5715) を使用し、展開溶剤としてヘキサン-酢酸エチル (7:3) で展開して測定した。

(11) 呈色反応：バニリン硫酸反応およびヨウ素反応が陽性、ニンヒドリン反応および塩化第二鉄反応が陰性である。

【0013】次に、第1の本発明による抗生物質AB5362

10 -Bの物理化学的性質を記載する。

- (1) 外 観：無色結晶
- (2) 分子式： $C_{25}H_{35}O_3$
- (3) 分子量：384
- (4) 比旋光度： $[\alpha]_D^{25} -6.0^\circ$ (c 1.0, アセトニトリル)
- (5) 紫外外部吸収スペクトル (アセトニトリル溶液中)：

λ_{max} 、nm(ϵ): 231(8,520)

20 【0014】(6) 赤外部吸収スペクトル(KBr錠)：添付図面の図4に示す。

(7) 1H -NMRスペクトル(500MHz、重クロロホルム中で測定)：添付図面の図5に示す。

(8) ^{13}C -NMRスペクトル(125MHz、重クロロホルム中で測定)：添付図面の図6に示す。

(9) 溶解性：メタノールのような低級アルコール、酢酸エチル、クロロホルムに可溶、水に不溶である。

30 【0015】(10) 薄層クロマトグラフィー：Rf値=0.39

吸着剤としてメルク社製キーゼルゲル 60F₂₅₄ (Art. 5715) を使用し、展開溶剤としてヘキサン-酢酸エチル (7:3) で展開して測定した。

(11) 呈色反応：バニリン硫酸反応およびヨウ素反応が陽性、ニンヒドリン反応および塩化第二鉄反応が陰性である。

【0016】第1の本発明による抗生物質AB5362-Cの物理化学的性質を記載する。

- (1) 外 観：白色粉末
- (2) 分子式： $C_{25}H_{35}O_2$
- (3) 分子量：368
- (4) 比旋光度： $[\alpha]_D^{25} -72^\circ$ (c 1.0, アセトニトリル)
- (5) 紫外外部吸収スペクトル (アセトニトリル溶液中)：

λ_{max} 、nm(ϵ): 240(8,550)

40 【0017】(6) 赤外部吸収スペクトル(KBr錠)：添付図面の図7に示す。

主なピーク：1730, 1680, 1620, 1450, 1405, 1380, 1230, 1190, 1140, 930, 880, 840, 760, 710 cm^{-1}

(7) 1H -NMRスペクトル(500MHz、重アセトニトリル中で測定)：添付図面の図8に示す。

(8) ^{13}C -NMRスペクトル(125MHz、重アセトニトリル中で測定): 添付図面の図9に示す。

(9) 溶解性: メタノールのような低級アルコール、酢酸エチル、クロロホルムに可溶、水に不溶である。

【0018】 (10) 薄層クロマトグラフィー: Rf値=0.51

吸着剤としてメルク社製キーゼルゲル 60F μm (Art. 5715) を使用し、展開溶剤としてヘキサン-酢酸エチル

(7:3) で展開して測定した。

(11) 呈色反応: バニリン硫酸反応およびヨウ素反応が陽性、ニンヒドリン反応および塩化第二鉄反応が陰性である。

【0019】 前記のバリエコリン(Variecolin)は前記の文献「J. Org. Chem.」36巻、10号、3403頁の記載値によると、 $[\alpha]_D^{25} -11.5^\circ$ (c 0.50、アセトニトリル) の旋光度を有するものであり、またその赤外吸収スペクト

【表1】

| 検 疫 菌 | M I C ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | | |
|--|-----------------------------------|----------|----------|
| | AB5362-A | AB5362-B | AB5362-C |
| トリコフィートン メンタグロフィータス (<i>Trichophyton mentagrophytes</i>) IFO 5486 | 8.25 | 50 | 25 |
| トリコフィートン アンテロイデス (<i>Trichophyton asteroides</i>) 429 | 12.5 | 100 | 100 |
| アスペルギルス フミガタス (<i>Aspergillus fumigatus</i>) IFO 9728 | 100 | >100 | >100 |
| フザリウム ソラニ (<i>Fusarium solani</i>) | 100 | >100 | >100 |
| カンジダ アルビカンス (<i>Candida albicans</i> 9147) | 100 | >100 | >100 |
| スポロスリックス シェンキイ (<i>Sporothrix schenckii</i>) IFO 8158 | 100 | >100 | >100 |

【0023】 試験例 2 抗生物質AB5362-A、-B および-C の植物病原菌に対する抗菌活性

抗生物質AB5362-A、-B および-C の各植物病原菌に対する最小生育阻止濃度(MIC)($\mu\text{g}/\text{ml}$) をポテト・ス

ルおよび紫外線吸収スペクトルの吸収ピーク値も本発明の抗生物質AB5362-C のそれと微妙に相違する。抗生物質AB5362-C はバリエコリンに対して立体異性体の関係にある新規物質であると現時点では推定されるが、物理化学的性質および生物学的活性の諸点で更に詳細な比較検討が予定されている。

【0020】 次に、本発明の抗生物質AB5362-A、-B および-C の生物学的活性を説明する。

【0021】 試験例 1 抗生物質AB5362-A、-B および-C の抗菌活性

抗生物質AB5362-A、-B および-C の動物感染性の各種真菌に対する最小生育阻止濃度(MIC)($\mu\text{g}/\text{ml}$) を感性感性ディスク培地(日本製薬製)を用いて寒天平板上で倍數希釈法にて測定した。その結果を表1に示した。

【0022】

クローズ寒天培地を用いた寒天平板希釈法にて測定した。その結果を表2に示した。

【0024】

【表2】

| 被 験 菌 | M I C (μg/ml) | | |
|--|---------------|----------|----------|
| | AB5362-A | AB5362-B | AB5362-C |
| ボトリチス シネレア (<i>Botrytis cinerea</i>) (灰色糸状菌) | 12.5 | >100 | >100 |
| コクリオボルス ミヤベアヌス (<i>Cochliobolus miyabeanus</i>) (粟力富枯病菌) | 25 | >100 | >100 |
| ディアポルテ シトリ (<i>Diaporthe citri</i>) (柿の黒点病菌) | 3.13 | >100 | >100 |
| ピリクラリア オリゼ (<i>Pyricularia oryzae</i>) P-2 (稲いもち病菌) | 6.25 | >100 | >100 |
| コレトリカム ラゲナリウム (<i>Colletotrichum lagenarium</i>) (トマト炭疽病菌) | 12.5 | >100 | >100 |
| ウスチラゴ メイジス (<i>Ustilago maydis</i>) (トウモロコシ黒穂病菌) | 6.25 | >100 | >100 |
| アルタナリア キクチアナ (<i>Alternaria kikuchiana</i>) (梨黒点病菌) | >100 | >100 | >100 |
| リゾクトニア ソラニ (<i>Rhizoctonia solani</i>) (稻抜枯病菌) | <0.4 | 25 | 50 |
| フザリウム オキシスポルム (<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>) IPO 9761 (トマト黒腐病菌) | 12.5 | >100 | >100 |
| グベレラ フジクロイ (<i>Gibberella fujikuroi</i>) (稲黒腐病菌) | 25 | >100 | >100 |

【0025】さらに、第2の本発明においては、ホーマ属に属する前記の抗生物質AB5362-A、-BおよびCの生産菌を培地で培養し、その培養物中に抗生物質AB5362-A、-BおよびCを生成して蓄積せしめ、次いで培養物から抗生物質AB5362-A、-BおよびCの少なくとも一つを採取することを特徴とする抗生物質AB5362-A、抗生物質AB5362-Bおよび(または)抗生物質AB5362-Cの製造法が提供される。

【0026】次に、第2の本発明による抗生物質AB5362-A、-BおよびCの製造法について説明する。

【0027】第2の本発明の方法で用いられる抗生物質AB5362-A、-BおよびCの生産菌は、抗生物質AB5362-A、-BおよびCを産生する能力を有する微生物であり、ばいかなる微生物でもよい。その微生物の具体的な例としては、本発明者らが神奈川県南足柄市の竹林より採取した土壌試料から新たに分離したAB5362菌株がある。この菌株はホーマ属(*Phoma*属)に属する菌株であり、本発明の方法に好適に用いられる抗生物質AB5362-A、-Bお

よびCの生産菌の一例である。

【0028】このAB5362株の菌学的性質を以下に記載する。

(1) 各培地における生育状態

オートミール寒天培地上において本菌株は良好に生育し、25℃、14日間培養で集落の直径は39~41mmに達する。集落はピロード状を呈し、各々の集落の中心部にはうす灰白色の気生菌糸を形成し、同心円状に輪紋を形成する。集落表面は灰白色~うす灰黒色を呈する。集落裏面はうす黒緑色を呈する。菌糸は隔壁を有して、培地上および培地中に伸長する。菌糸は幅が2.0~5.0μmで、無色、平滑で分枝する。

【0029】麦芽エキス寒天培地およびポテト・デキストロース寒天培地上における生育は、オートミール寒天培地上に比べやや遅く、25℃、14日間培養では集落の直径が15~17mmに達する。集落は綿毛状で不規則な輪紋を形成し、集落表面は灰白色~うす灰黒色を呈する。また、培養10日目頃から集落表面の綿毛状菌糸のところで

ころに、黄褐色の斑点を生ずる。集落表面はうす黒褐色を呈する。

【0030】コーンミール寒天培地および三浦寒天培地における生育は、麦芽エキスを寒天培地上と同様で、25℃、14日間培養で集落の直径が17~19mmに達する。集落は綿毛状で、集落表面は灰白色~うす灰黒色を呈する、集落表面はうす黒褐色を呈する。しかし、麦芽エキスを寒天培地上で見られた集落表面の黄褐色の斑点は、培養1か月目においても観察されなかった。

【0031】MY20寒天培地における生育はやや遅く、25℃、14日間培養で集落の直径が18~20mmに達する。集落はビロード状で、集落表面はうす灰白色~クリーム色を示し、集落表面はうす黄褐色を呈する。

【0032】この菌株を上記の寒天培地において、25℃、暗黒下で2か月間培養した場合に、テオモルフ（完全世代の特徴）およびアナモルフ（不完全世代の特徴）の形成は認められなかった。そこで、上記の寒天培地上で25℃、暗黒下で7日間培養後、さらに25℃、ブラック・ライト・ブルー蛍光灯(20w)連続照明下で培養した結果、培養2か月後にオートミール寒天培地、麦芽エキスを寒天培地および三浦寒天培地上で暗褐色~暗黒色の分生子殻（pycnidium）の形成が観察された。三浦寒天培地上における分生子殻は、暗褐色を呈して、寒天培地中に埋生するか、または培地上に表在し、単生するかあるいは集合して生じる。分生子殻は、球形~亜球形あるいは扁球形で網目状の表面を呈し、直径は80~300 μmで、通常、頂部に1個の孔口、ときに2~3個の孔口を有する。分生子形成細胞は、無色、平滑のフィアライド（phialide）でアンブル形~フラスコ形で、大きさは6.0~15.0×2.0~3.5 μmである。分生子は単細胞、無色、平滑で、だ円形~円筒形、大きさが2.5~4.0×2.0~2.5 μmである。

【0033】(2) 生理学的性質

①生育温度

麦芽エキスを寒天培地を用いて、5℃、10℃、15℃、20℃、25℃、30℃および37℃の各温度で培養した結果、AB5362株は10℃~30℃までいずれの温度でも生育したが、5℃および37℃では生育しなかった。生育最適温度は25℃~30℃である。

②生育pH

オートクレーブ滅菌後、pHを2、3、4、5、6、7、8、9、10および11に調整した麦芽エキスを寒天培地を用いて、25℃で培養した結果、AB5362株はpH4~11まで生育した。生育最適pHは、pH6~11と思われる。

【0034】(3) 分類学的考察

AB5362株は、1)子座におおわれない分生子殻を有す、2)分生子殻は剛毛を有さない、3)分生子の形成方法が出芽型、4)分生子の形成様式がフィアライド型、5)分生子が単細胞、無色、平滑の特徴を有する。以上の質的性状により、AB5362株は不完全菌門（Deuteromycotina）

分生子果不完全菌綱（Coelomycetes）に帰属すると認められる。本菌株の分類学上の位置をブライアン・シー・サットン著、「ザ・シーロマイセチス」、英国コモモンウェルス・マイコロジカル・インスティテュート刊行（1980年）[Brian C. Sutton, "The Coelomycetes", Commonwealth Mycological Institute, England (1980)]に従って検索したところ、本菌株の特徴はホーマ属（*Phoma* 属）の形態学的特徴によく合致した。従って、本発明者らは、本菌株をホーマ属の菌株と特定しAB5362株をホーマ・エスピー AB5362 (*Phoma* sp. AB5362) と称することにした。

【0035】なお、AB5362株は工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託申請され、平成8年6月11日、FERM P-15679として受託されている。

【0036】以上では、抗生物質AB5362-A、-B および-Cの生産菌の一例であるAB5362株について説明したが、一般的には糸状菌類はその菌学的性状が極めて変化しやすく、一定したものではない。菌類は、自然的あるいは通常行なわれている紫外線照射、X線照射、変異誘発剤（例えば、N-メチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジンなど）または遺伝子組換えを用いる人為的変異手段により変異することは周知の事実である。このような自然変異株ならびに人工変異株も含め、ホーマ属に属して抗生物質AB5362-A、-B および-Cを生産する能力を有する菌株はすべて本発明の方法に使用することができる。

【0037】第2の本発明の方法を実施するに当たっては、ホーマ属の糸状菌に属する抗生物質AB5362-A、-B および-Cの生産菌を、通常の微生物が利用しうる栄養物を含有する培地、好ましくは液体培地中で培養する。本生産菌の培養には、微生物の培養に用いられる通常の培養方法が適用される。使用された微生物が栄養源として資化しうる炭素源、窒素源および無機塩などを適量で含有する培地であれば天然培地、合成培地のいずれでも利用できる。

【0038】用いる培地に含有される資化しうる炭素源としては、グルコース、シュクロース、ガラクトース、デキストリン、グリセロール、澱粉、水飴、糖蜜、動・植物油等を利用できる。また、窒素源としては、魚粉、大豆粉、小麦胚芽、コーンステープリカー、綿実かす、肉エキス、ペプトン、酵母エキス、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、尿素などを使用できる。そのほか必要に応じて、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、塩素、燐酸、硫酸およびその他のイオンを生成することができる無機塩類を培地中に添加することは有効である。また、使用する抗生物質AB5362-A、-B および-Cの生産菌の発育を助け、AB5362-A、-B および-C物質の生産を促進するような無機物質および（または）有機物質を適当に添加できる。

【0039】抗生物質AB5362-A、-B および-Cの生産菌

の培養方法には、好気的条件下での培養法、特に通気下の深部液体培養法が最も適している。培養に適切な温度は、15℃～30℃であるが、多くの場合25～30℃で培養するのがよい。抗生物質AB5362-A、-B および-Cの生産は、用いた培地の種類や培養条件によって異なるが、振とう培養、タンク培養とも3～10日間の培養でその蓄積量が最高に達する。

【0040】培養物中に生産された抗生物質AB5362-A、-B および-Cの蓄積量が最高に達した時点で培養を停止して、その培養物から、発酵生産物を採取する一般的な方法に準じて抗生物質AB5362-A、-B および-Cの単離を行なうのがよい。これら抗生物質を効率よく生産させる培養条件は、前記の培地成分の組成、培養温度、攪拌速度、pH、通気量、種母の培養時間、種母の接種量等を使用する生産菌株の種類および外部条件等に応じて、適宜に調節あるいは選択して設定する。液体培養において発泡がある場合は、シリコーン油、植物油および界面活性剤等の消泡剤を単独または混合して適宜に培地に配合することができる。

【0041】この様にして抗生物質AB5362-A、-B および-C 生産菌の培養で得られた培養物中に蓄積された抗生物質AB5362-A、-B および-Cは、前述した物理化学的性質を有するので、それらの性質に従い培養物から分離して精製することが可能である。特に、以下の方法により効率的に分離精製することが好ましい。

【0042】蓄積した抗生物質AB5362-A、-B および-Cを培養物中から採取するに際しては、通常の生理活性物質を培養物中から単離する方法が適用される。すなわち培養液からブタノールによる抽出法、また菌体からメタノール等の有機溶剤による抽出法により、あるいは水または二種類以上の有機溶媒系を用いる逆流分配法により、もしくは合成吸着樹脂、シリカゲル、シラナイズドシリカゲル、アルミナ、セルロース、珪藻土、ゲル濾過剤、活性炭等を用いるカラムクロマトグラフィーもしくは薄層クロマトグラフィーによる活性物質の吸着処理法により、あるいは逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーなどによって抗生物質AB5362-A、-B および-Cの少なくとも一つを夫々単独にまたは混合物として採取できる。

【0043】第3の本発明および第4の本発明によると、前記の抗生物質AB5362-A、-B および-Cの少なくとも一つを有効成分として含有することを特徴とする医療用の抗真菌剤および農薬用殺菌剤がそれぞれ提供される。

【0044】抗生物質AB5362-A、-B および-Cの少なくとも一つを医療用の抗真菌剤で有効成分として使用する場合には、経口的または非経口的に投与できる。

【0045】これには、有効成分である上記の抗生物質を単独に、あるいは賦形剤と配合した組成物の形にして軟膏剤、注射剤、経口剤、坐剤等として製剤化できる。

賦形剤は薬剤学的に許容される固体又は液体状の担体であればいずれでもよく、その種類および組成は投与経路や投与方法によって適宜選択する。抗生物質AB5362-A、-B または-Cの投与量は、年齢、体重等によって異なるが、通常は成人に対して1～1000mg程度を経口的にあるいは非経口的に、例えば静脈注射により投与できる。

【0046】一方、本発明の抗生物質AB5362-A、-B および-Cの少なくとも一つを農薬用殺菌剤で有効成分として用いる場合には、その使用目的に応じて単体でも施用できるが、生物効果を助長または安定化するために、農薬に常用される適当な担体および補助剤例えば界面活性剤と混和して製剤化された組成物とし、これを直接に植物の茎葉または種子に施用するか、あるいは必要に応じて水で希釈した液を施用する。

【0047】第5の本発明によると、新規な微生物として、前記の抗生物質AB5362-A、-B および-Cを生産できる特性を持ち、かつ前記の菌学的特徴を有するホーマ・エスピー AB5362株が提供される。

【0048】

【発明の実施の形態】次に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、後記の実施例は単なる一例であって、これによって本発明が限定されない。また、ここに例示しなかった多くの変法または修飾手段が用いられることは言うまでもなく可能であり、有効な手段となり得る。なお、実施例中に部とあるのは重量部を示している。

【0049】実施例 1

本例は抗生物質AB5362-A、-B および-Cの発酵的製造を例示する。菌の培養に用いた生産培地は、ブドウ糖 1.0%、溶性デンプン 3.0%、ポリペプトン 0.5%、酵母エキス 0.2%、マルトエキス 0.5%、炭酸カルシウム 0.2%の組成からなる(pH 6.4)。

【0050】前記の組成の培地110mlを分注した500ml容量バツフル付き三角フラスコ91本(培地の総量10リットル)を121℃で20分間滅菌した。滅菌された培地に1本当たりホーマ・エスピー AB5362株(FERM P-15679)の斜面寒天培養菌体の1～2白金耳を接種した。

【0051】その後、ロータリーシェーカー(180rpm)上で25℃で6日間、回転振とう培養した。培養終了後、培養液を濾過することにより、培養濾過液9リットルを得た。上記の培養濾過液9リットルに等量の酢酸エチルを加え、十分に攪拌後に酢酸エチル層を分液した。この酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、減圧下で濃縮し、活性成分を含有する褐色油状物質を得た。

【0052】この褐色油状物質を、シリカゲル(メルク社製)を充填させたカラム(内径22.5mm×長さ 250mm)に吸着させ、ヘキサン-酢酸エチル(7:3)の組成からなる混合溶媒で展開溶出した。10gずつ分画すると、活性成分は画分 No. 25～33および No. 35～57にかけて溶出された。活性画分 No. 25～33を減圧下で濃縮乾固する

ことにより活性成分AB5362-Bを含む白色粉末26.5mgを得た。さらにこれを、少量の酢酸エチルに溶解させた後、ヘキサンを過量加え、室温で放置することにより無色結晶を得た。次にこの結晶を濾過し、抗生物質AB5362-Bを無色結晶として14.5mg得た。また、活性成分No.35~57を減圧下で濃縮乾固することにより抗生物質AB5362-Aを無色粉末として470.0mg得た。

【0053】実施例 2

本例は抗生物質AB5362-Bの発酵的製造を例示する。菌の培養に用いた生産培地は、ブドウ糖 1.0%、溶性デンプン 3.0%、ポリペプトン 0.5%、酵母エキス 0.2%、マルトエキス 0.5%、炭酸カルシウム 0.2%の組成からなる(pH 6.4)。

【0054】前記の組成の培地 110mlを分注した500ml容量バッフル付き三角フラスコ91本(培地の総量10リットル分)を121℃で20分間滅菌した。滅菌された培地に1本当たりホーマ・エスピー AB5362株(FERM P-15679)の斜面寒天培養菌体の1~2白金耳を植菌した。

【0055】その後、ロータリーシェーカー (180rpm)上で25℃で6日間、回転振とう培養した。培養終了後に、培養液を濾過することにより、培養濾液と菌体を得た。上記の濾別された菌体中の活性物質はメタノール5リットルで菌体から抽出し、濾過により菌体を除いた菌体抽出液として得た。この菌体抽出液から減圧下でメタノールを溜去し、得られた濃縮液1リットルに等量の酢酸エチルを加え、十分に攪拌後に酢酸エチル層を分液した。この酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、減圧下で濃縮し、活性成分を含有する褐色油状物質を得た。

【0056】この褐色油状物質を、シリカゲル(メルク社製)を充填させたカラム(内径22.5mm×長さ250mm)に吸着させ、ヘキサン-酢酸エチル(7:3)の組成からなる混合溶媒で展開溶出した。15gずつ分画すると、活性成分は画分No.12~20にかけて溶出された。活性成分No.12~20を減圧下で濃縮乾固することにより活性成分AB5362-Bを含む白色粉末21.8mgを得た。さらにこれを、少量の酢酸エチルに溶解させた後、ヘキサンを過量加え、室温で放置することにより無色結晶を得た。次にこの結晶を濾過し、抗生物質AB5362-Bを無色結晶として10.2mg得た。

【0057】実施例 3

本例は抗生物質AB5362-Cの発酵的製造を例示する。菌の培養に用いた生産培地は、ブドウ糖 1.0%、溶性デンプン 3.0%、ポリペプトン 0.5%、酵母エキス 0.2%、マルトエキス 0.5%、炭酸カルシウム 0.2%、の組成からなる(pH 6.4)。

【0058】前記の組成の培地 110mlを分注した500ml容量バッフル付き三角フラスコ91本(培地の総量10リットル分)を121℃で20分間滅菌した。滅菌された培地に1本当たりホーマ・エスピー AB5362株(FERM P-15679)

の斜面寒天培養菌体の1~2白金耳を植菌した。

【0059】その後、ロータリーシェーカー(180rpm)上で25℃で6日間、回転振とう培養した。培養終了後に、培養液を濾過することにより、培養濾液9リットルを得た。上記の培養濾液9リットルに等量の酢酸エチルを加え、十分に攪拌後に酢酸エチル層を分液した。この酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、減圧下で濃縮し、活性成分を含有する褐色油状物質を得た。

【0060】この褐色油状物質を、シリカゲル(メルク社製)を充填させたカラム(内径22.5mm×長さ250mm)に吸着させ、ヘキサン-酢酸エチル(7:3)の組成からなる混合溶媒で展開溶出した。10gずつ分画すると、活性成分は画分No.16~23にかけて溶出された。活性成分No.16~23を減圧下で濃縮乾固することにより活性成分としてAB5362-C物質を含む白色粉末29.5mgを得た。さらにこの白色粉末を、少量をクロロホルムに溶解させた後、シリカゲル薄層クロマト(メルク社製)に吸着させ、クロロホルム-メタノール(15:1)の組成からなる混合溶媒で展開する薄層クロマトグラフィーを行なった。Rf 0.50付近のUV吸着帯をかきとり、酢酸エチルで活性成分を溶出させ、減圧下で濃縮乾固することにより抗生物質AB5362-Cを白色粉末として15.3 mg得た。

【0061】次に、第3の本発明による抗生物質AB5362-A、-BおよびCの少なくとも一つを含有する農薬用殺菌剤の製剤例を実施例4~6に例示する。

実施例 4 (水和剤)

抗生物質AB5362-A、AB5362-BまたはAB5362-C 20部、アルキルベンゼンスルホン酸カリウム 3部、ポリオキシニチレンノニルフェニルエーテル 5部および白土 72部を均一に混合し、粉碎して、有効成分を20%含有する各種の水和剤を得た。

【0062】実施例 5 (粉剤)

抗生物質AB5362-A、AB5362-BまたはAB5362-C 2部、PAP(物理性改良剤) 1部およびクレー 97部を均一に混合し、粉碎して、有効成分を2%含有する各種の粉剤を得た。

【0063】実施例 6 (乳剤)

抗生物質AB5362-A、AB5362-BまたはAB5362-C 30部、メチルエチルケトン 40部およびポリオキシニチレンノニルフェニルエーテル 30部を混合し、溶解して、有効成分を30%含有する各種の乳剤を得た。

【0064】次に、本発明による抗生物質AB5362-A、-Bまたは-Cを含む農薬用殺菌剤の植物病害防除効果を試験例3~4について説明する。

試験例 3 キュウリべと病の防除効果試験

温室内において直径6cmの大きさのビニール樹脂製ポットで土耕栽培した第2葉期のキュウリ苗(品種:相模半白)に対して、実施例4に準じて調製した水和剤の所定濃度希釈液を1鉢当たり20mlの量で散布した。一方、湿らせた鉢でキュウリべと病菌(シュドペロノスポラ クベ

ンシス：*Pseudoperonospora cubensis*) が感染した罹病葉より胞子をかきとり、展着剤（ポリオキシニチレンアルキルエーテル）の 50ppm 水溶液に懸濁させた後、胞子濃度を 5×10^4 胞子数(個/ml) に調整して胞子懸濁液を調製した。

【0065】このキュウリべと病菌の胞子懸濁液を薬剤散布 1 日後のキュウリ苗に噴霧接種した。次いでキュウリ苗を 20℃、湿度 100% の湿室内に 2 日間静置し、その

後、発病室に移し、キュウリべと病を発病させた。接種 6 日後、1 葉当たりのキュウリべと病病斑面積歩合(%) を調査し、平均病斑面積を求めて、下記の計算式により平均防除価(%)を算出した。本試験は 1 葉濃度区当り 2 連割で行なった。その試験結果は後記の表 3 に示すとおりである。

【0066】

$$\text{防除価}(\%) = \left(1 - \frac{\text{散布区の病斑面積歩合}}{\text{無散布区の病斑面積歩合}}\right) \times 100$$

【0067】さらに平均防除価(%) から下記の基準により防除効果の評価値を求めた。また、下記の被害調査の基準により、キュウリ（品種：相模半白）に対する薬

害も調査した。

【0068】

| 平均防除価(%) | 防除効果の評価値 |
|-----------|----------|
| 100% | 5 |
| 80～100%未満 | 4 |
| 60～80%未満 | 3 |
| 40～60%未満 | 2 |
| 20～40%未満 | 1 |
| 20%未満 | 0 |

〈被害の調査指数〉

5：激甚 4：甚 3：多 2：若干 1：わずか 0：なし

【0069】

【表3】

| 供試化合物 | 散布濃度の有効成分濃度(ppm) | 防除効果の評価値 | 被害 |
|-----------------|------------------|----------|----|
| A B 5 3 6 2 - A | 100 | 2 | 2 |
| | 25 | 0 | 0 |
| | 6 | 0 | 0 |
| A B 5 3 6 2 - B | 100 | 5 | 0 |
| | 25 | 3 | 0 |
| | 6 | 3 | 0 |
| A B 5 3 6 2 - C | 100 | 3 | 0 |
| | 25 | 1 | 0 |
| | 6 | 0 | 0 |

【0070】試験例 4 オオムギうどんこ病の防除効果試験

湿室内において直径 6 cm の大きさのビニール樹脂製ポットで土耕栽培した第 2 葉期のオオムギ苗（品種：アサマ）に対して、実施例 4 に準じて調製した水和剤の所定濃度希釈液を 1 鉢当り 20 ml の量で散布した。一方、湿らせた筆でオオムギうどんこ病菌（エリシフィエ グラミニ

ス エフ エスピー ホールディ：*Erysiphe graminis* f. sp. hordei) が感染した罹病葉より胞子をかきとり、展着剤（ポリオキシニチレンアルキルエーテル）の 50 ppm 水溶液に懸濁させた後、胞子濃度を 5×10^4 胞子数(個/ml) に調整して胞子懸濁液を調製した。

【0071】このオオムギうどんこ病菌の胞子懸濁液を薬剤散布 1 日後のオオムギ苗に噴霧接種後、オオムギ苗

を20℃、湿度100%の湿室内に1日間静置し、その後、
発病室に移し、オオムギうどんこ病を発病させた。接種
8日後、1葉当たりのオオムギうどんこ病病斑面積歩合
(%)を調査し、平均病斑面積を求め、下記の計算式に

$$\text{防除値 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{散布区の病斑面積歩合}}{\text{無散布区の病斑面積歩合}} \right) \times 100$$

【0073】さらに平均防除値(%)から下記の基準に
より防除効果の評価値を求めた。また、下記の被害調査
の基準により、オオムギ(品種:アサマ)に対する被害

より平均防除値(%)を算出した。本試験は1葉液濃度
区当り2区制で行なった。その試験結果は後記の表4に
示すとおりである。

【0072】

も調査した。

【0074】

| 平均防除値 (%) | 防除効果の評価値 |
|-----------|----------|
| 100% | 5 |
| 80～100%未満 | 4 |
| 60～80%未満 | 3 |
| 40～60%未満 | 2 |
| 20～40%未満 | 1 |
| 20%未満 | 0 |

〈被害の調査指数〉

5:激甚 4:甚 3:多 2:若干 1:わずか 0:なし

【0075】

【表4】

| 試化合物 | 散布液の 有効成分濃度 (ppm) | 防除効果 の評価値 | 被害 |
|----------|-------------------------|--------------|----|
| AB5362-A | 100 | 1 | 0 |
| | 25 | 0 | 0 |
| | 6 | 0 | 0 |
| AB5362-B | 100 | 1 | 0 |
| | 25 | 0 | 0 |
| | 6 | 0 | 0 |
| AB5362-C | 100 | 4 | 0 |
| | 25 | 3 | 0 |
| | 6 | 1 | 0 |

【0076】

【発明の効果】本発明の新規抗生物質AB5362-A、-B お
よびCは、以上に述べたように人間および動物に感染
する真菌に抗真菌活性を有し、また植物病原菌に抗菌活
性を有することから、医療用抗真菌剤および農薬用殺
菌剤として有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の抗生物質AB5362-Aの臭化カリウム錠
剤中で測定した赤外線吸収スペクトル図である。

【図2】抗生物質AB5362-Aの重クロロホルム中で測定
した¹H核磁気共鳴スペクトル図である。

40 【図3】抗生物質AB5362-Aの重クロロホルム中で測定
した¹³C核磁気共鳴スペクトル図である。

【図4】本発明の抗生物質AB5362-Bの臭化カリウム錠
剤中で測定した赤外線吸収スペクトル図である。

【図5】抗生物質AB5362-Bの重クロロホルム中で測定
した¹H核磁気共鳴スペクトル図である。

【図6】抗生物質AB5362-Bの重クロロホルム中で測定
した¹³C核磁気共鳴スペクトル図である。

【図7】本発明の抗生物質AB5362-Cの臭化カリウム錠
剤中で測定した赤外線吸収スペクトル図である。

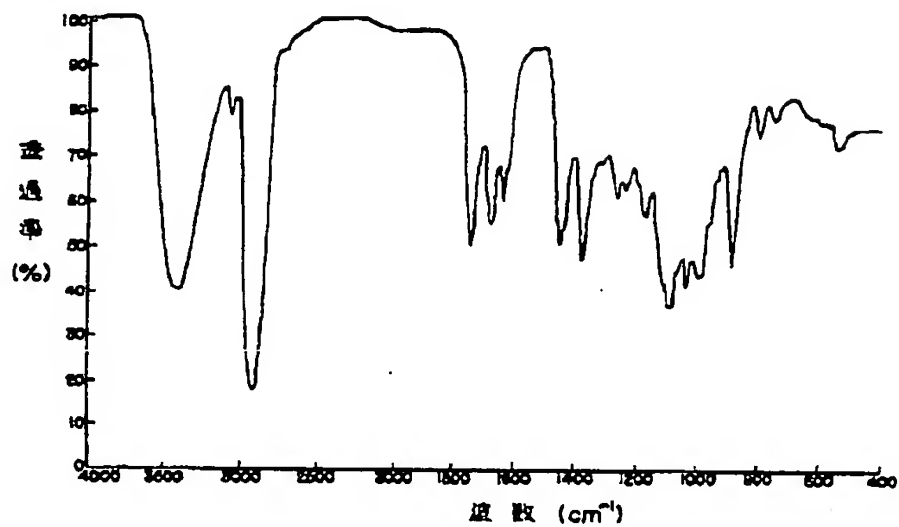
50 【図8】抗生物質AB5362-Cの重アセトニトリル中で測

定した ^1H 核磁気共鳴スペクトル図である。

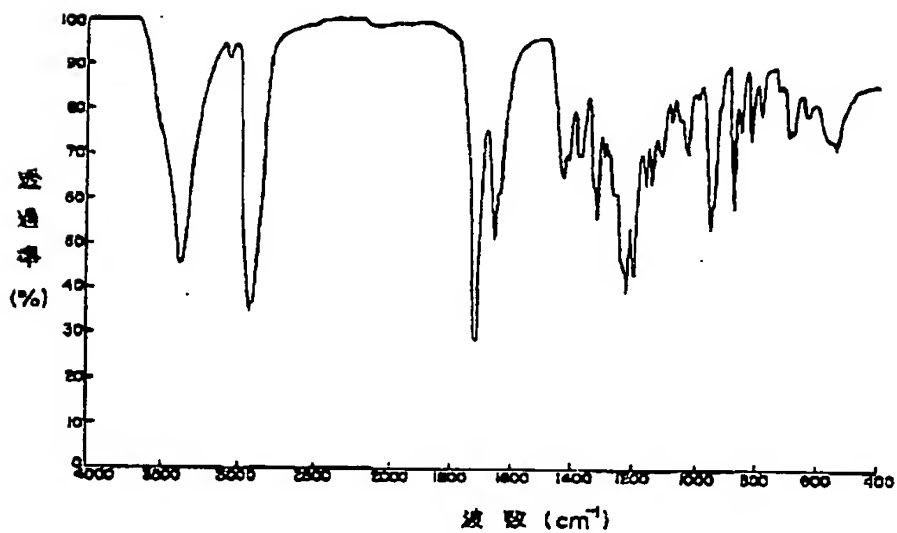
定した ^{13}C 核磁気共鳴スペクトル図である。

【図9】抗生物質AB5362-Cの重アセトニトリル中で測

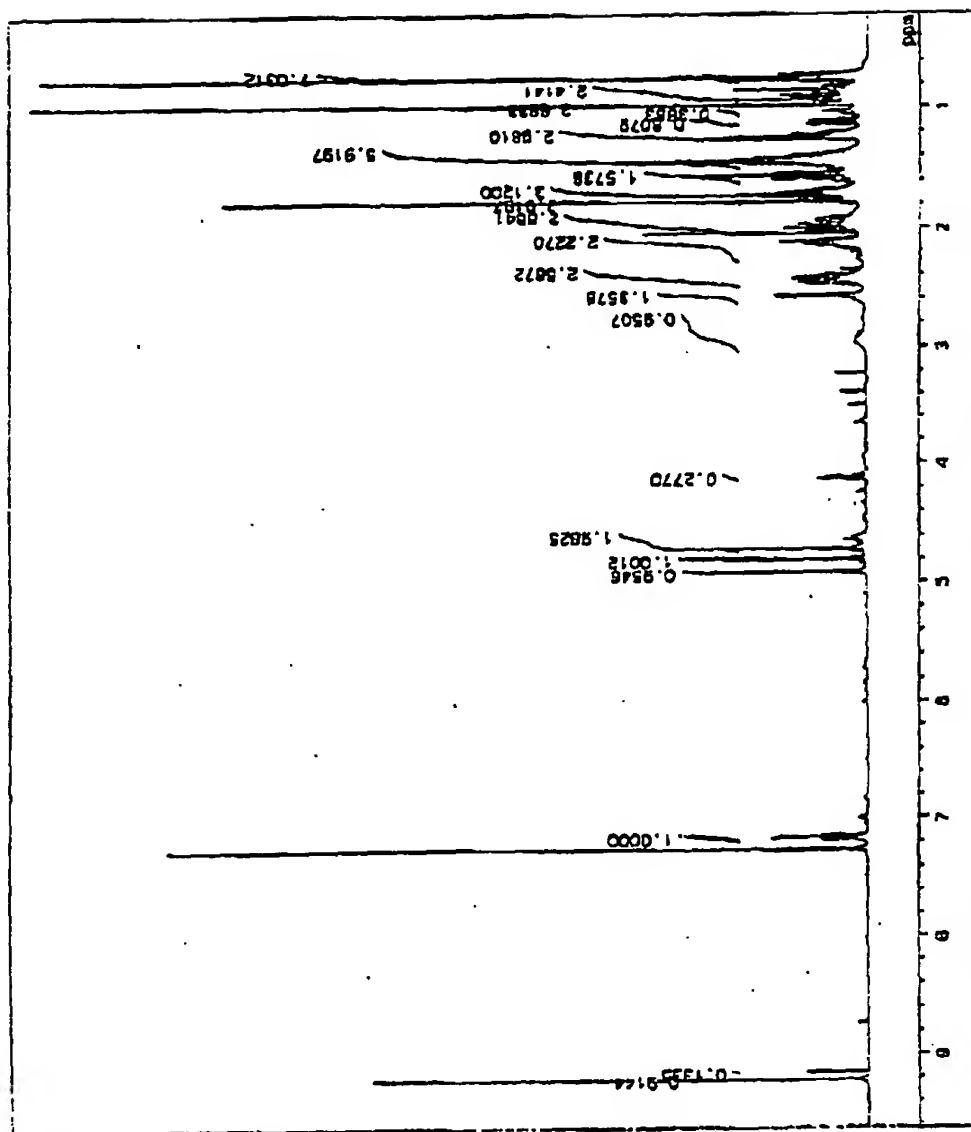
【図1】



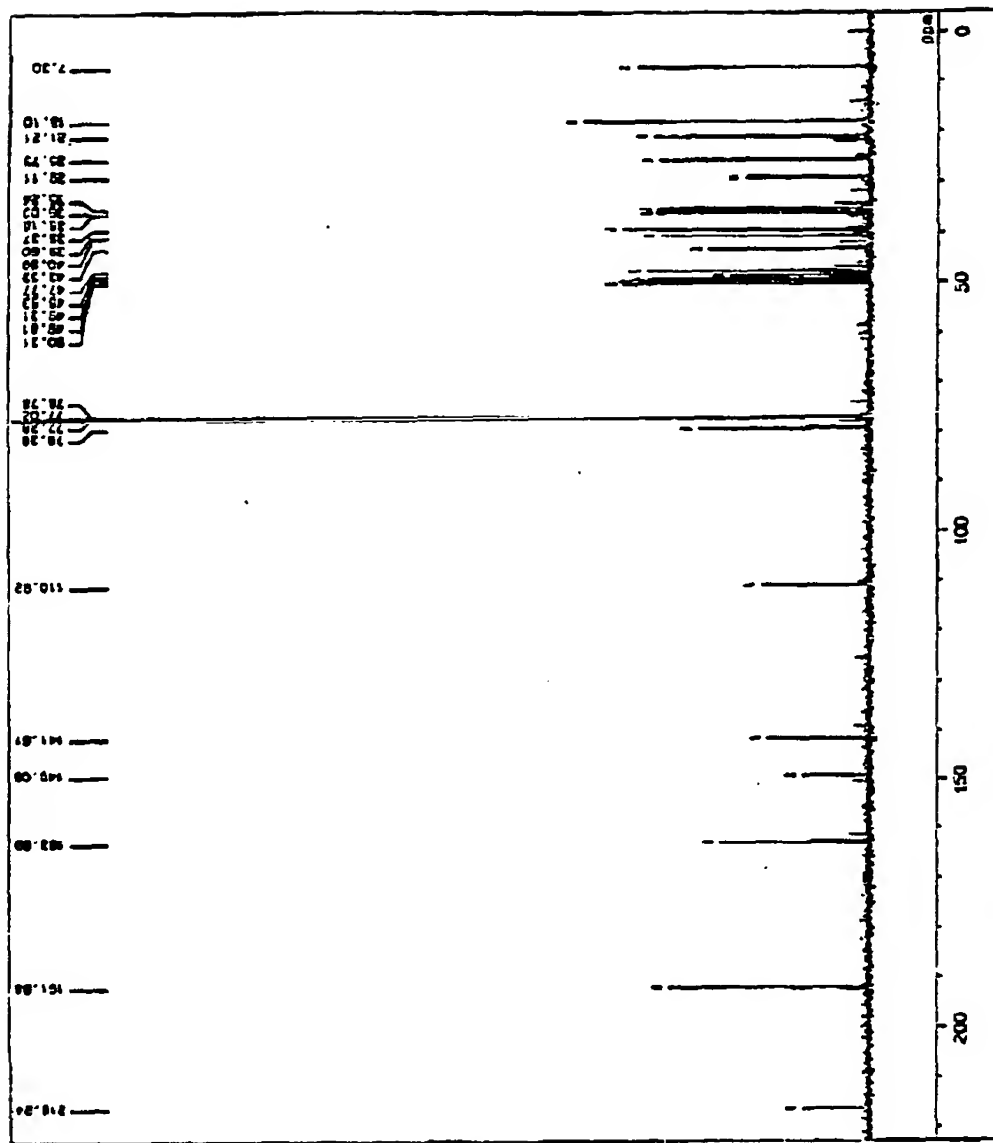
【図4】



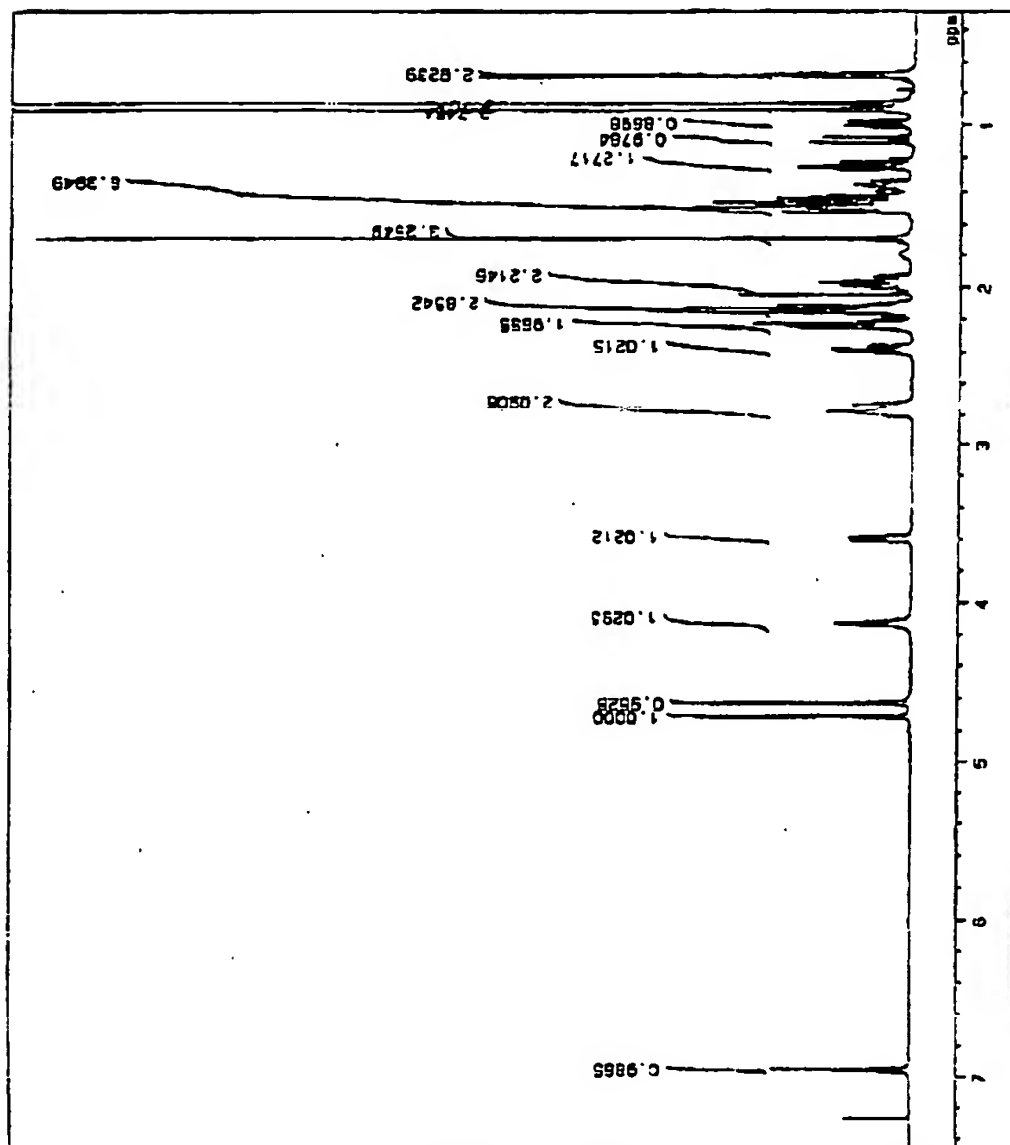
【図2】



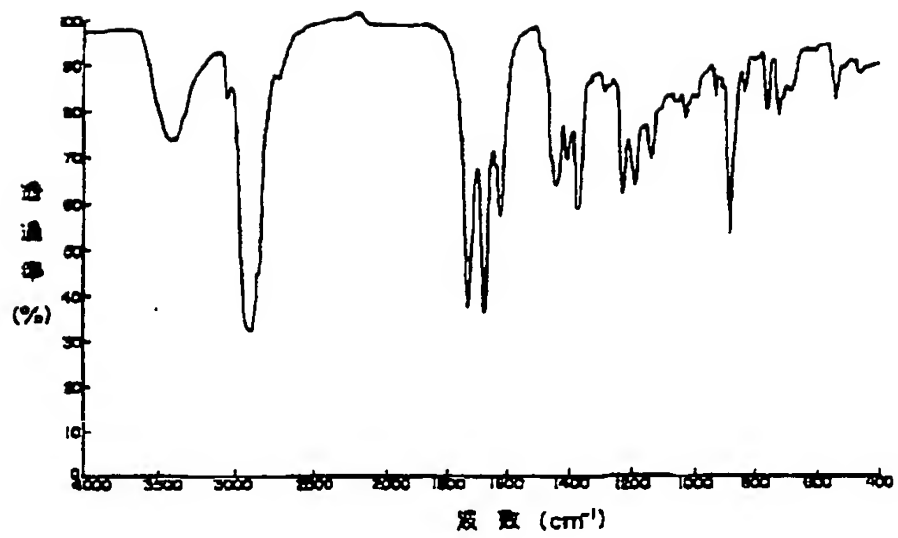
【図3】



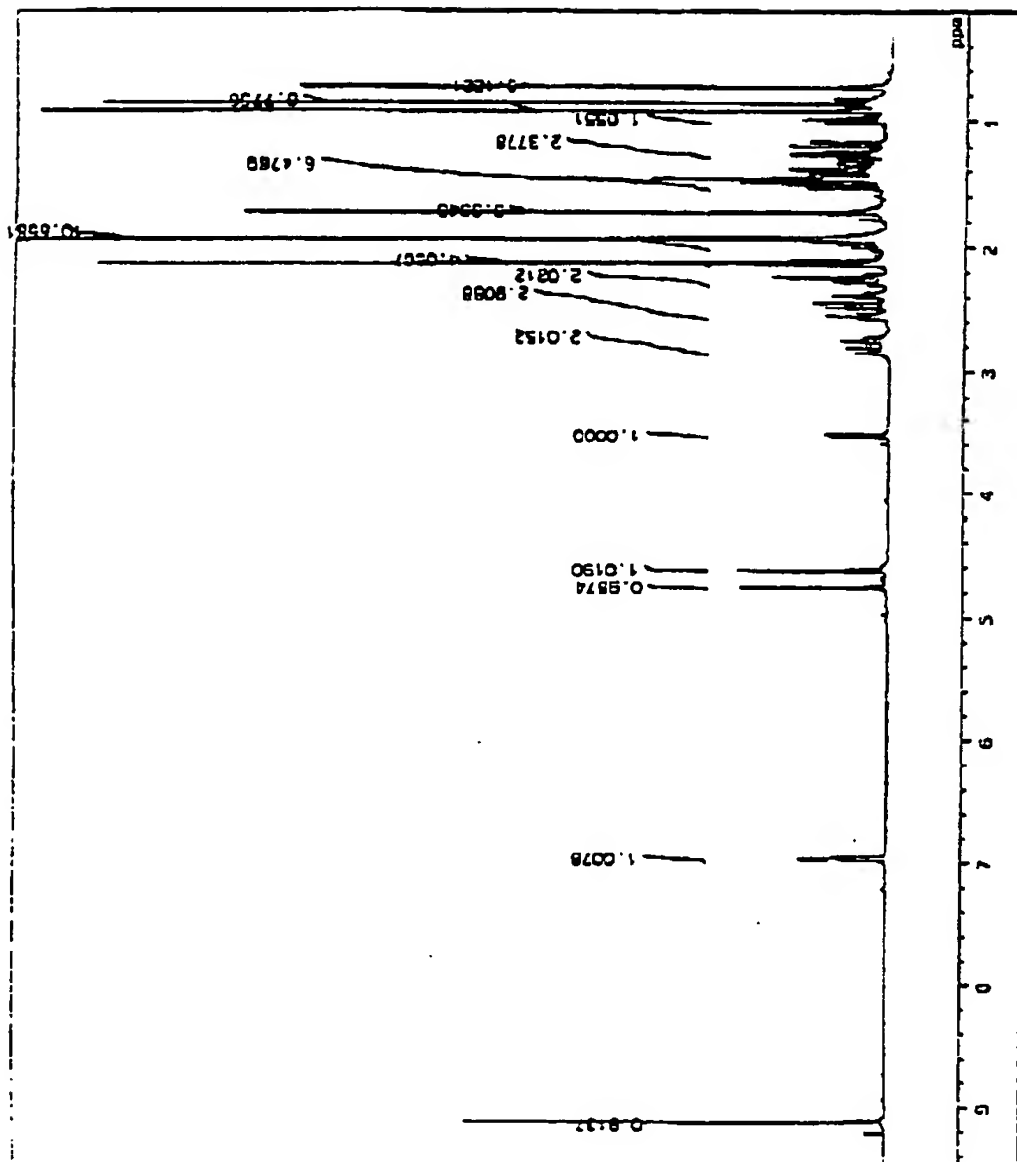
【5】



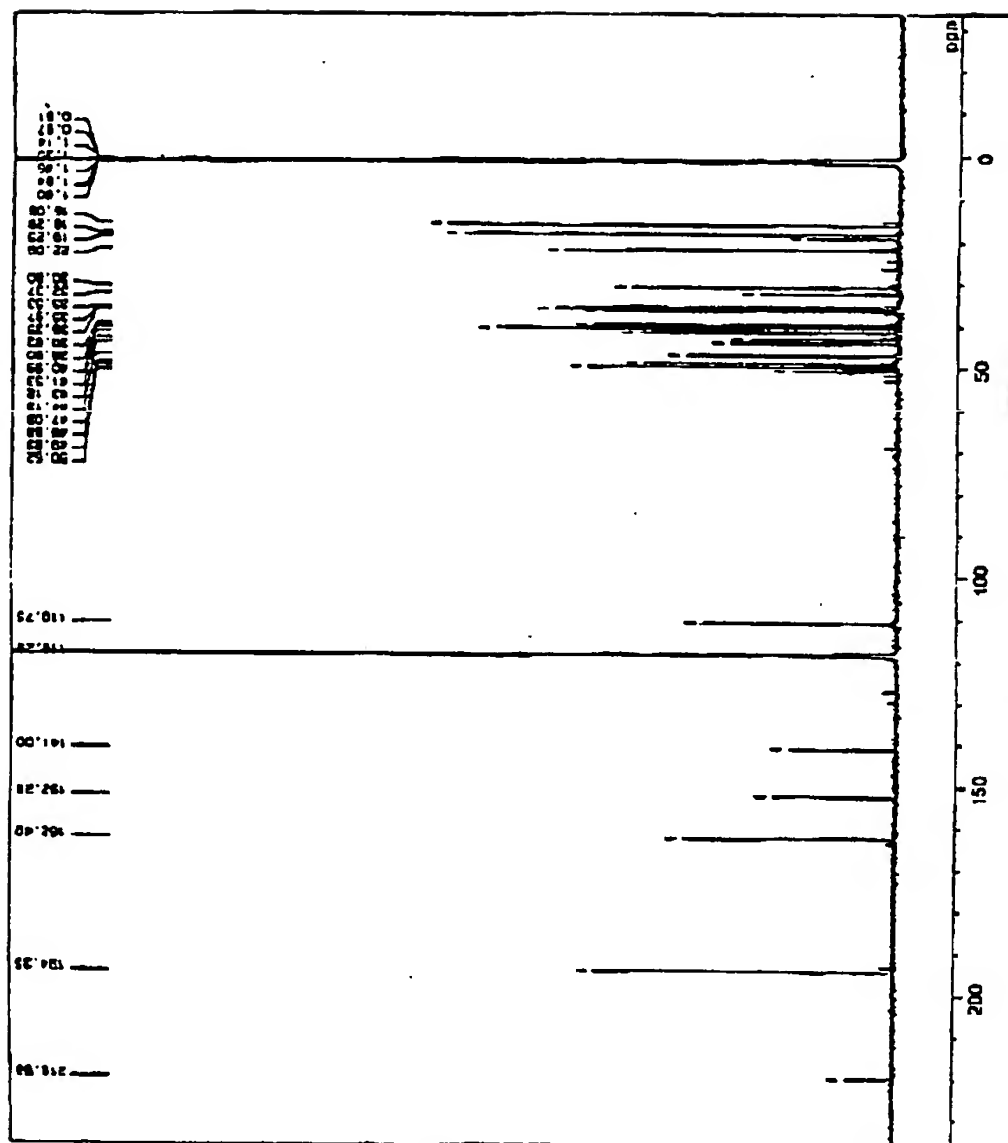
【図7】



【図8】



【図9】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

C 1 2 P 15/00

17/04

//(C 1 2 P 17/04

C 1 2 R 1:645)

識別記号

庁内整理番号

F I

C 1 2 P 15/00

17/04

技術表示箇所

(72)発明者 丸山 雅人

神奈川県厚木市旭町5丁目37番地12号

(72)発明者 玉村 健

神奈川県相模原市京林間6丁目2番3号

(72)発明者 久津間 誠一
神奈川県厚木市妻田東1丁目5番9号
901

(72)発明者 長縄 博
東京都大田区田園調布本町3番17号
(72)発明者 竹内 富雄
東京都品川区東五反田5丁目1番11号 ニ
ューフジマンション701